



# 体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における早期姉妹染色分体分離の誘発要因究明

著者	菊地 裕幸
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17052号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/64016">http://hdl.handle.net/10097/64016</a>

体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における  
早期姉妹染色分体分離の誘発要因究明

菊 地 裕 幸

## 【目次】

第一章	緒論	5
第二章	体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における成熟率と染色体数に影響を及ぼす培養条件の探索	
	はじめに	11
第一節	体内成熟卵子と体外成熟卵子の染色体数の評価	13
	材料および方法	
	1. 未成熟卵母細胞の体外成熟培養と成熟率の評価	
	2. 体内成熟卵子の採取	
	3. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価	
	結果	
第二節	体外成熟培養時間の違いによる成熟率と染色体数の評価	18
	材料および方法	
	1. 体外成熟培養と成熟率の評価	
	2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価	
	結果	
第三節	体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度の違いによる成熟率と染色体数の評価	20
	材料および方法	
	1. 体外成熟培養と成熟率の評価	
	2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価	
	結果	
考察		22
第三章	卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子の評価	
	はじめに	25

## 第一節 紡錘体および染色体配列の評価 . . . . . 26

材料および方法

1. 体外成熟培養による成熟卵子の採取と固定
2. 免疫蛍光染色法による紡錘体および染色体の局在解析

結果

## 第二節 受精能、胚発生能評価 . . . . . 29

材料および方法

1. 体外成熟培養による成熟卵子の採取
2. 精液採取と精子の活性化
3. 媒精および受精率の評価
4. 体外受精胚の培養と胚発生率の評価

結果

## 第三節 第一分割期における染色体数の評価 . . . . . 33

材料および方法

1. 体外成熟培養による成熟卵子の採取
2. 精液採取と精子の活性化
3. 媒精
4. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

結果

## 第四節 人為的裸化卵母細胞の成熟率と受精能、胚発生能評価および染色体数の評価 . . . . . 35

材料および方法

1. 体外成熟培養と成熟率の評価
2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価
3. 精液採取と精子の活性化
4. 媒精および受精率の評価
5. 体外受精胚の培養と胚発生率の評価

結果

## 考察 . . . . . 38

## 第四章 未成熟裸化卵母細胞の早期姉妹染色分体分離を誘発する要因の探索 はじめに . . . . . 42

<b>第一節    第一減数分裂中期における紡錘体の評価</b> . . . . .	43
材料および方法	
1. 体外成熟培養による卵子の採取と固定	
2. 免疫蛍光染色法による紡錘体および染色体の局在解析	
結果	
<b>第二節    Spindle Assembly Checkpoint (MAD2) の評価</b> . . . . .	44
材料および方法	
1. 体外成熟培養による卵子の採取と固定	
2. 免疫蛍光染色法による MAD2 の局在解析	
結果	
考察 . . . . .	46
<b>第五章    早期姉妹染色分体分離を抑制する試み</b>	
はじめに . . . . .	49
<b>第一節    単純組成培地による PCS 発生率および受精能、胚発生能</b>	
評価 . . . . .	50
材料および方法	
1. 体外成熟培養と成熟率の評価	
2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価	
3. 精液採取と精子の活性化	
4. 媒精および受精率の評価	
5. 体外受精胚の培養と胚発生率の評価	
結果	
<b>第二節    卵丘細胞共培養による PCS 発生率評価</b> . . . . .	53
材料および方法	
1. 体外成熟培養と成熟率の評価	
2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価	
結果	
考察 . . . . .	55

第六章	総括	57
図表		64
引用文献		85
謝辞		92

# 第一章

## 緒論

ヒト不妊治療における体外受精や顕微授精といった生殖補助医療 (assisted reproductive technology; ART) は、配偶子及び受精卵の体外培養操作技術の発展や培養液の改良により、受精率や妊娠率、着床率などの臨床成績が向上している。日本産科婦人科学会の報告によると、2013 年の総出生児のうち、24 人に 1 人が生殖補助医療による出生児であり、生殖補助医療技術はもはや必要不可欠なものとなっている。

未成熟卵母細胞（卵子）の体外成熟－体外受精－体外培養 (*in vitro* maturation-*in vitro* fertilization-*in vitro* culture; IVM-IVF-IVC) は、卵巣より未成熟 (GV 期) 卵母細胞を採取し、体外成熟培養 (*in vitro* maturation; IVM) を経て得られた成熟 (MII 期) 卵子を体外受精 (*in vitro* fertilization; IVF) に用い、体外培養 (*in vitro* culture; IVC) ののちに子宮内に胚移植 (embryo transfer) を行う方法である。ウシやブタなどの家畜においては、食肉処理場由来の卵巣から回収した多数の未成熟卵母細胞を、体外成熟培養で成熟卵子を得ることで、より効率的な生産が可能な技術として開発された。

ヒト生殖補助医療においては、通常ゴナドトロピン製剤投与による卵巣刺激を行い、多数の体内成熟卵子を回収し体外受精を行う IVF による治療が行われている。一方で IVM-IVF は、未成熟段階の卵子を採取するため、ゴナドトロピン製剤投与による卵巣刺激をほとんど行わないことから、治療に対する身体的、精神的、経済的負担を軽減することが可能な方法と考えられている。特に多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovarian syndrome; PCOS) 患者においては、卵巣刺激により卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome; OHSS) を発症するリスクが高まるため、IVM-IVF は有用な治療法として臨床応用され、1991 年 Cha らによって初の妊娠出産成功例が報告された。



さらに近年では、凍結保存技術の向上により、多数の卵子を含む卵巣組織や組織切片での凍結も可能となっている。この技術は、白血病やガン疾患等の患者において、化学療法や放射線療法による治療前に、妊孕性温存を目的とした多数の未成熟卵母細胞の凍結保存を行うことが可能となり、原疾患治療後、妊娠を望む際には、体外成熟培養技術により成熟卵子を得ることが必要不可欠となる。

しかし、体内成熟卵子を用いる IVF に比べて体外成熟卵子を用いる IVM-IVF における成熟率、胚発生率 (Eppig JJ et al., 1998; Mermillod P et al., 1999; Moor R et al., 2001; Trounson A et al., 2001)、着床率 (Cha KY et al., 2000; Child TJ et al., 2001; Piquette GN, 2006; Lanzendorf SE, 2006) は、いまだ低いのが現状である。

体外成熟卵子における受精率、胚発生率の低下は、不十分な細胞質成熟が原因の一つと考えられている。また、着床率の低さは胚の異数性、倍数性などの染色体異常と関連していることが IVF (Voullaire L et al., 2007)、IVM (Requena A et al., 2009) で報告されている。体外成熟卵子は体内成熟卵子に比べて染色体異常の割合が高い (Emery BR et al., 2005) ことや、染色体異常は主に卵子の第一減数分裂時の分離異常によって生じる (Hassold T et al., 1980; Angell RR et al., 1994; Hunt PA et al., 1998) ことが報告されていることから、体外成熟培養過程における染色体異常の発生が、体内成熟卵子と比較して成熟率、胚発生率、着床率が低下している原因であることが推測される。

卵子は胎児期に体細胞分裂を完了し、出生時には第一減数分裂前期 (卵核胞期 germinal vesicle: GV) の大部分を終了し停止している。そして性成熟後減数分裂が再開し、卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown: GVBD) を起こし、第

一減数分裂中期 (metaphase I: MI) を経て第一極体を放出し、第二減数分裂中期 (Metaphase II: MII) で再び停止し、排卵されて受精に備える (Fan HY et al., 2004; Liang CG et al., 2007)。この過程を一般的に「卵成熟」と呼び、卵子の減数分裂は連続した 2 回の核分裂からなる。第二減数分裂は体細胞分裂と似た姉妹染色分体の分離が起こり、第一減数分裂では父方および母方由来の相同染色体の分離が起こる。しかし、第一減数分裂中期に対合した 2 本の相同染色体の不分離による倍数性異常、早期に姉妹染色分体が分離し染色体の過不足となる異数性異常などの染色体異常が生じる。染色体の過不足は、細胞の遺伝子発現のバランスを失わせ、致命的な影響を及ぼす。

染色体異常のなかでも、近年加齢個体における早期姉妹染色分体分離 (Premature chromatid separation; PCS) が指摘されており (Duncan FE et al., 2012)、本来第二減数分裂で分離すべき姉妹染色分体が、第一減数分裂時に動原体付近で早期に分離してしまうことで、その後の過程で染色体の過不足が生じることが報告されている。

また、ヒト胚はマウスやハムスターなどに比べて染色体異常が生じやすい (Zenzes MT et al., 1992) ことが知られており、受精卵の染色体異常は約 25%、新生児では 0.3%に見られる (Hassold T et al., 2001)。倍数性異常や染色体の不足などの重篤な染色体異常であれば発育停止や流産、死産となり自然淘汰されることで出生まで至ることはないが、ヒトの場合 18 トリソミー (エドワーズ症候群)、21 トリソミー (ダウン症候群) などの常染色体異常や、XXY (クラインフェルター症候群)、X (ターナー症候群) などの性染色体異常など、染色体異常の種類や程度によっては妊娠継続、出生まで至ることが可能な場合もある (Yamanaka et al., 2006)。しかし、染色体異常をもった児は精神遅滞、奇形などの先天性疾患を伴う場合も多く、さらに次世代以降にも遺伝的疾患として影

響することが懸念される。

これらのことから、卵子体外成熟培養過程における染色体異常発生のリスクを減らすことは重要であると考えられる。しかし、体外成熟培養とその後の胚発育過程における染色体分析を詳細に行っている報告は少ない。

そこで本研究では、マウス卵子をモデルとして、体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における培養環境や条件の違いによる染色体への影響やその誘発要因を究明することにより、その後の成熟率、胚発生率、着床率の改善や、最終的には健児の獲得へとつながる、染色体異常のリスクが低い最適な体外成熟培養系を確立し、ヒト IVM-IVF への臨床応用を目指すことを目的とした。

## 第二章

体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における  
成熟率と染色体数に影響を及ぼす培養条件  
の探索

## はじめに

通常、未成熟卵母細胞は卵巣の卵胞内で成熟が起こるが、体外環境でも体内に近い環境で培養を行うことで、受精能をもつ成熟卵子を得ることができる。

しかし、体外培養環境は、温度、気層条件、培地の組成など様々な条件が関係しており、未だ体内環境を完全に再現するに至ってはいない。

これまでに、体外成熟培養過程における培養条件と染色体異常について、ウシにおける卵胞サイズ、培地、温度、培養時間 (Ocaña-Quero JM et al., 1999)、卵丘細胞付着程度 (Shioya Y et al., 1988)、ブタにおける培養時間 (Sosnowski J et al., 2003)、マウスにおける培地 (A'arabi SY et al., 1997)、FSH 添加 (Roberts R et al., 2005)、ヒトにおける FSH 添加 (Xu YW et al., 2011) などの報告があり、染色体異常とこれら多様な培養環境は、密接に関連していることが明らかである。

その中でも、Ocaña らや Sosnowski らは、ウシやブタにおいて体外成熟培養時間が長くなるにつれて有意に成熟率が高くなる一方で、2 倍体の割合も有意に増加すると報告している。

さらに、Shioya らは、ウシにおいて体外成熟培養時の付着卵丘細胞が減少するにつれて、成熟率や受精率、胚発生率に差が生じると報告している。通常体外成熟培養では、発達した卵胞内に存在する、卵丘細胞が数層にも密に付着した未成熟卵母細胞を供しているが、ヒトにおいては、卵巣ごと採取し未成熟卵母細胞を回収するのではなく、卵胞を針で穿刺、吸引し回収するため、その過程で卵丘細胞が脱落してしまうこともあり、また採取する卵胞の発育段階は必ずしも均一ではないため、卵丘細胞付着は様々である。しかし、妊娠へと至るために、体外成熟培養で 1 個でも多くの成熟卵子、着床、出生可能な受精卵を

得ることが求められ、採取されたすべての未成熟卵母細胞を培養に用いる必要がある。

よって本章では、体外成熟培養過程における卵子成熟および染色体数に影響を及ぼす培養条件を探索すべく、培養時間の違い、卵丘細胞付着程度の違いにおける卵子成熟率、染色体数を評価した。

## 第一節 体内成熟卵子と体外成熟卵子の染色体数の評価

体外成熟培地として、Waymouth's MB 752/1 Medium を用いた場合の卵子成熟率を調べた。さらに、体内成熟卵子と体外成熟卵子における染色体数を調べた。

### 材料および方法

#### 1. 未成熟卵母細胞の体外成熟培養と成熟率の評価

3週齢の未成熟ICR雌マウスに5IUのPMSG(セロトロピン; あすか製薬)を腹腔内投与し(調整法は後述)、48時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、卵巣を滅菌したろ紙上に摘出した。摘出した卵巣は、インキュベーターにて予め37℃に保温した操作培地(組成は後述)に移し、26G針付きシリンジ(Terumo)で卵胞を裂いて卵核胞(germinal vesicle; GV)期の卵丘細胞-卵母細胞複合体(cumulus-oocyte complex; COC)を採取した。卵丘細胞が4層以上付着した良好なCOCを選別し、Waymouth's MB752/1(Invitrogen)培地(組成・作成法は後述)で3回洗浄後、100μlのドロップで20個以下のCOCを、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で12時間培養を行った。

成熟培養後、COCはHyaluronidase(組成は後述)中でピペッティングにより卵丘細胞を取り除き、実体顕微鏡下でGV期、第一減数分裂中期(Metaphase I)、第二減数分裂中期(Metaphase II)の判定を行った。第一極体放出が確認された卵子を成熟卵子と判定した。

#### PMSG(5IU)の調整と投与法

製品アンプル(1000IU)に生理的食塩水を1ml添加し、ピペッティングにより完全に溶かした後、1.5mlチューブに50μlずつ分注し、-20℃で保存した。使用

直前に生理食塩水 (0.85% NaCl) を 950 $\mu$ l 添加し、1 匹あたり 100 $\mu$ l を腹腔内投与した。

#### 操作培地の組成

- Leibovitz's L-15 Medium (Invitrogen)

添加 : 5% Fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)

#### 卵子成熟培地の組成

- Waymouth's MB752/1 Medium (Invitrogen)

添加 : 5% Fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)

0.23mM Pyruvic acid (Wako)

#### 卵子成熟培地 (100 $\mu$ l) の作成法

35mm のディッシュ (住友ベークライト) にオートピペットを用いて成熟培地 50 $\mu$ l のドロップを 4 つ作製し、ミネラルオイル (ナカライテスク) で覆った。再び成熟培地のドロップに成熟培地 50 $\mu$ l を加えることで、1 つのドロップの液量を 100 $\mu$ l とした。続いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間以上静置し平衡化を行い、COC の培養に用いた。

#### Hyaluronidase の組成

- MilliQ 水

添加 : PBS (Nissui)

0.1% Hyaluronidase (Sigma)

0.1% Polyvinyl alcohol (PVA, Sigma)



## 2. 体内成熟卵子の採取

3 週齢の未成熟 ICR 雌マウスに 5IU の PMSG を腹腔内投与し、48 時間後に 10IU の hCG (プベローゲン; エール製薬) を同様に投与し (調整法は後述)、14 時間後に頸椎脱臼により安楽死させ、卵管を摘出した。摘出した卵管は、インキュベーターにて予め 37℃ に保温した操作培地に移し、26G 針付きシリンジで卵管膨大部を裂いて体内成熟卵子を採取した。

### hCG (5IU) の調整と投与法

製品アンプル (1000IU) に生理的食塩水を 1ml 添加し、ピペッティングにより完全に溶かした後、1.5ml チューブに 50 $\mu$ l ずつ分注し、-20℃ で保存した。使用直前に生理食塩水 (0.85% NaCl) を 950 $\mu$ l 添加し、1 匹あたり 100 $\mu$ l を投与した。

## 3. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

3 連ホールグラスに低張液 (調整法は後述) 400 $\mu$ l を分注し、成熟卵子を数回洗浄した後次の溶液に移し、常温で 15 分低張処理を行った。次の溶液に 20 $\mu$ l の固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1) を加え、卵子を入れて弱固定を行った。次第に卵細胞質が褐色へと変化するのを確認し、予め 70% エタノールに浸漬し裏からダイヤモンドペンで印を付けた 1 枚のスライドガラスに、極少量の液とともに 1 個の卵子を載せた。液が乾燥する直前に、固定液をスライド上から 1 滴ずつ、2~3 滴滴下して拡散させながら固定し、細胞膜が次第に見えなくなるまで確認し、室温で乾燥させた。胚の固定操作は、加湿器を用い十分な加湿条件下で行った。

PBS (Wako) から 2% ギムザ染色液 (Merck) を調整し、作製した標本を 10

分間染色し、水洗ののち乾燥させた。観察は生物顕微鏡にてノーカバーレンズを用いて×1000 の倍率で行った。

染色体数が 20 本を正倍数体 (Euploid)、15-19.5 本を染色体不足 (Hypoploid)、20.5-25 本を染色体過剰 (Hyperploid)、40 本を二倍体 (Diploid) と判定した。また、早期姉妹染色分体分離 (Premature chromatid separation; PCS) の発生率についても評価を行った。

ギムザ染色による MII 期卵子の染色体像は図 1 に示した。

#### 低張液の調整法

・滅菌精製水

添加：1% クエン酸三ナトリウム二水和物 (Wako)

0.5% Bovine serum albumin (BSA; Sigma)

#### 統計解析

成熟率および染色体数正常率のデータは、カイ二乗検定を用いた。全てのデータは、 $P < 0.05$  のときに統計的に有意であるとした。

#### **結果**

Waymouth's MB752/1 培地を用いた体外成熟培養の結果は表 1 に示した。

II 期、GVBD、GV 期卵子の割合は、91.1%、5.7%、3.2%であった。

体外成熟卵子と体内成熟卵子の染色体数の結果は表 2 に示した。

染色体数正常の卵子の割合は、体外成熟卵子：93.6%、排卵卵子（体内成熟卵子）：93.6%であり、有意な差は見られなかった。染色体数過不足の卵子の割合、

PCS 発生率においても、差は見られなかった。

この結果から、本実験で用いた Waymouth's MB752/1 培地における体外成熟卵子は、染色体数において体内成熟卵子と遜色ないことが明らかとなった。

## 第二節 体外成熟培養時間の違いによる成熟率と染色体数の評価

第一節に用いた卵子体外成熟培地で、培養時間を 4 区に設けて行い、それぞれの成熟率、成熟卵子における染色体数を調べた。

### 材料および方法

#### 1. 体外成熟培養と成熟率の評価

未成熟卵母細胞の採取、体外成熟培養、成熟率の評価は、第一節に準じて行った。成熟時間において、10、12、16、20 時間の 4 区を設け成熟培養を行った。

#### 2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

卵子染色体標本作製と染色体数の評価は、第一節に準じて行った。

### 結果

体外成熟培養時間の違いによる成熟培養の結果は表 3 に示した。

MII 期卵子の割合は、10 時間：95.1%、12 時間：95.1%、16 時間：96.6%、20 時間：97.8%であり、培養 10 時間で既にほとんどの卵子が MII 期であり、成熟率は 10 時間以降プラトーに達していた。

体外成熟培養時間の違いによる卵子染色体数の結果は表 4 に示した。

染色体数正常の卵子の割合は、10 時間：93.5%、12 時間：93.3%、16 時間：89.4%、20 時間：90.4%であり、それぞれの培養時間で有意な差は見られず、成熟後のエイジングによる影響も確認できなかった。一方で、16 時間、20 時間において、わずかに染色体数不足の卵子の割合が上昇していた。

この結果から、本実験で設定した体外成熟培養時間では、ほとんどの卵子が

すでに成熟していることが明らかとなった。また成熟後、培養を延長した場合においても MII 期の時点での卵子染色体数に影響が見られないことが明らかとなった。

### 第三節 体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度の違いによる成熟率と染色体数の評価

通常家畜では卵丘細胞の付着が認められない卵母細胞は培養には用いられないが、ヒトにおいて未成熟卵母細胞を回収する際、卵胞より針で吸引する過程で卵丘細胞が脱落してしまっている可能性もあることから、未成熟卵母細胞を卵丘細胞付着程度から 3 区に設けて培養を行い、それぞれの成熟率、成熟卵子における染色体数を調べた。

#### 材料および方法

##### 1. 体外成熟培養と成熟率の評価

未成熟卵母細胞の採取、体外成熟培養、成熟率の評価は第一節に準じて行った。成熟培養に用いる未成熟卵母細胞の選択において、Grade A、Grade B、Grade C (分類法は後述) の 3 区を設けて成熟培養を行った。

卵丘細胞付着程度の違いによる未成熟卵母細胞の分類は図 2 に示した。

#### 未成熟卵母細胞の分類法

Grade A: 4 層以上の密な卵丘細胞が付着した COC (第一、第二節で使用)

Grade B: 3 層以下、または部分的に卵丘細胞が付着した COC

Grade C: 卵丘細胞の付着がなく、裸化状態の卵母細胞

##### 2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

卵子染色体標本作製と染色体数の評価は、第一節に準じて行った。

## 結果

卵丘細胞付着程度の違いによる成熟培養の結果は表 5 に示した。

MII 期卵子の割合は、Grade A：98.2%、Grade B：85.3%、Grade C：54.3%、であり、Grade A、Grade B、Grade C の順に有意に低下しており、Grade C では 12 時間後に GV 期のままである卵子も多く存在した。

卵丘細胞付着程度の違いによる卵子染色体数の結果は表 6 に示した。

染色体数正常の卵子の割合は、Grade A：94.4%、Grade B：95.5%、Grade C：86.8%であり、有意な差は見られないものの Grade C でわずかに低下していた。染色体数過不足の卵子の割合においては、Grade C でのみ染色体過剰、2 倍体の卵子が見られた。

PCS 発生率は、Grade A：1.1%、Grade B：10.6%、Grade C：47.2%であり、Grade A、Grade B、Grade C の順に有意に発生頻度が上昇しており、Grade A ではほとんど発生が確認されないのに対し、Grade C ではおよそ半数の卵子において確認された。Grade C から得られた成熟卵子の染色体数は、86.8%が  $n=20$  と染色体の量的な異常はなかったことから、ほとんどが卵細胞質と第一極体に均等に染色体が分離された「均衡型」の PCS であることが考えられた。

この結果から、本実験で設定した卵丘細胞付着程度の違いでは、付着卵丘細胞の減少に伴い、成熟率が有意に低下することが明らかとなった。また成熟卵子においても、付着卵丘細胞の減少に伴い、染色体数異常の卵子が増える傾向があり、PCS 発生は劇的に上昇することが明らかとなった。

## 考察

本章では、体外成熟培養環境において卵子成熟および染色体数に影響を及ぼす因子を明らかにするため、体外成熟培養時間の違い、卵丘細胞付着程度の違いに着目し、検証を行った。

本検討において、培養 10 時間以降の成熟率の変動は少なく、成熟後も 20 時間まで体外培養を行った卵子においても、染色体異常への影響は認められなかった。

培養時間と染色体異常において、これまでに体外成熟培養時間に依存して染色体異常が上昇することが報告されている。しかし、10 時間で約 90%の卵子は既に成熟しており、染色体数過不足による異常率も他の時間区と同等であったことから、20 時間まで培養を継続し、遅れて成熟した卵子が染色体異常を起こしていた可能性があっても、本結果への影響は少ないと考えられた。成熟後の体外培養の延長は、卵子のエイジングとなり、受精遅延やその後の胚発生に影響することが明らかとなっている。よって、第二減数分裂以降の染色体分配において不具合が生じ、染色体異常が発生することも考えられる。

卵丘細胞を 3 区に分類し、成熟率および染色体数を検証したところ、卵丘細胞付着の減少に伴って成熟率の有意な低下や、PCS 発生の有意な上昇が認められた。

卵丘細胞付着と染色体異常について、Shioya ら (1988) は、ウシにおいて本実験と同様に卵丘細胞付着程度によって 3 区に分類して検討を行ったところ、付着卵丘細胞の減少に伴い有意に成熟率が低下することを報告している。卵丘細胞は、ギャップジャンクションを介して卵子へとアミノ酸やピルビン酸を供



給しており (Brower PT et al., 1982、Sutton ML et al., 2003)、卵丘細胞が欠如した卵母細胞は核成熟や細胞質成熟能が低下する (Chin AH et al., 2004)。さらには、卵子の酸素消費量は卵子の成熟能の重要な指標となり、卵子の呼吸量は周囲を覆っている卵丘細胞の量に影響する (Murakawa H et al., 2009) ことも明らかとなっている。

本章での検証の結果、マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養過程において、体内成熟卵子と体外成熟卵子の染色体数、体外成熟卵子の培養時間の違いは、成熟率および染色体数に影響を及ぼさなかった。一方で、体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度の違いは、成熟率や PCS 発生率に差が生じたことから、未成熟卵母細胞の核成熟および PCS 発生に影響を与える因子であることが明らかとなった。

卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞を用いた体外成熟培養にて得られた成熟卵子の細胞小器官の形態的差異や、受精能、胚発生能を評価することによって、細胞質成熟への影響を調べる必要がある。

## 第三章

卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞  
より得られた成熟卵子の評価

## はじめに

第二章において、卵丘細胞付着程度の違いが成熟率低下や PCS 発生率上昇を引き起こしていることが明らかとなった。しかし、成熟率が低い、PCS 発生率が高い培養条件において得られた成熟卵子が異常であるとは言えない。そこで本章では、得られた成熟卵子の正常性を調べるべく、卵子の細胞小器官や、受精能、胚発生能、染色体数を評価した。

## 第一節 紡錘体および染色体配列の評価

紡錘体および染色体の形態を調べるために、微小管を構成する  $\alpha$ -tubulin に対する免疫蛍光染色を行った。

## 材料と方法

### 1. 体外成熟培養による成熟卵子の採取と固定

体外成熟卵子は第二章 第三節に準じて採取した。成熟卵子は裸化後、100 $\mu$ l の洗浄液（作製法は後述）に移し、3 回洗浄を行った。洗浄後、成熟卵子は固定液（組成は後述）にゆっくりと移し、40 分間室温で静置することにより固定を行った。洗浄液で同様に 3 回洗浄した後、200 $\mu$ l の保存液（作製法は後述）を入れた 1.5ml チューブに成熟卵子を入れ、染色に供するまで 4°C で保存した。

### 洗浄液の作製法

PBS (Nissui)	0.48g
PVA (Sigma)	0.05g (0.1%)

MilliQ 水で 50ml に調整後、0.2 $\mu$ m フィルターでろ過滅菌を行った。

### 洗浄液 (100 $\mu$ l) の作成法

90mm のディッシュ（アズワン）にダコペン（Dako）で円を 3 つ描き、それぞれの円内にオートピペットを用いて 100 $\mu$ l の洗浄液のドロップを作製した。

### 固定液の作製法

MilliQ 水	10ml
Paraformaldehyde (Sigma)	0.2g (2%)

PVA (Sigma) 0.01g (0.1%)

TritonX-100 (Wako) 20 $\mu$ l (0.2%)

調整後、0.2 $\mu$ m フィルターでろ過滅菌を行った。

#### 保存液の作製法

PBS (Nissui) 0.48g

PVA (Sigma) 0.05g (0.1%)

BSA (Sigma) 0.5g (1%)

MilliQ 水で 50ml に調整後、0.2 $\mu$ m フィルターでろ過滅菌を行った。

## 2. 免疫蛍光染色法による紡錘体および染色体の局在解析

90mm のディッシュにダコペンで円を描き、固定した成熟卵子を 200 $\mu$ l の保存液ごとオートピペットを用いて円内に移した。 $\alpha$ -tubulin に対する一次抗体反応には、Monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (T-9026; Sigma) を保存液で 500 倍希釈して用いた。抗体液 40 $\mu$ l に成熟卵子を移し、遮光のモイストチャンバー内で 1 時間、室温で静置し一次抗体反応を行った。その後、保存液で 3 回洗浄した。二次抗体反応液には、FITC 標識 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A-11029; Molecular probes) を保存液で 200 倍希釈して用いた。抗体液 40 $\mu$ l に成熟卵子を移し、遮光のモイストチャンバー内で 40 分間、室温で静置し二次抗体反応を行った。反応後、保存液で 3 回洗浄した。成熟卵子は少量の保存液とともにスライドガラス上に移し、カバーガラスの 4 隅をパラフィン:ワセリン=1:9 の混合剤でスポットし、成熟卵子が中央に位置するように覆った。ピンセットでカバーガラスの 4 隅を押して成熟卵子を保定した。透過液 (2.5% Tween-20 (Wako) を含んだ洗浄液) をカバーガラス脇から流し込み、遮光のモイストチャンバー内

で 10 分間、室温で静置し透過処理を行った。その後、保存液で洗浄した。核染色には 10 $\mu$ g/ml propidium iodide (PI, Sigma) をカバーガラス脇から流し込み、遮光のモイストチャンバー内で 30 分間、室温で静置し反応させ、保存液で洗浄した。観察まで遮光のモイストチャンバー内で 4℃で保存した。観察には、共焦点レーザー走査顕微鏡 (MRC-1024, Bio-Rad) を使用した。

## 結果

卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子の免疫蛍光染色の結果は図 3 に示した。

紡錘体の形態は、**Grade A** ではコンパクトな樽型の形態を示し、染色体は紡錘体内に一直列に整列していたが、**Grade C** では紡錘体が伸長し、長方形様の形態を示した。染色体は紡錘体範囲外にも存在し、一部逸脱した染色体も観察された。

この結果から、卵丘細胞付着程度の違いでは、付着卵丘細胞の減少に伴い紡錘体形態や染色体配列に異常性が見られることが明らかとなった。

## 第二節 受精能、胚発生能評価

得られた成熟卵子の受精能、胚発生能を評価するために、体外受精・体外培養を行い、受精率、胚発生率を調べた。

### 材料と方法

#### 1. 体外成熟培養による成熟卵子の採取

成熟卵子の採取は第二章 第三節に準じて行った。

#### 2. 精液採取と精子の活性化

交配に使用し受胎能を確認した 8～12 週齢の成熟 ICR 雄マウスを、約 1 週間雌マウスと隔離し精液採取に用いた。この成熟雄マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、精巣上体を滅菌したろ紙上に摘出した。摘出した精巣上体は、インキュベーターにて予め平衡化を行った 400 $\mu$ l の精子前培養培地（組成・作成法は後述）に入れ、精巣上体尾部の下方をピンセットでつまみ、尾部全体を膨張させ、26G 注射針で裂き、15 分間インキュベーター内で静置し、精子を自然に培地中に懸濁させた。その後、精子前培養培地 0.8ml を入れた 1.5ml のチューブの底面にパスツールピペットを用いて精子懸濁液をゆっくりと静置し、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 3 時間培養を行い、スィムアップならびに Capacitation（受精能獲得）を誘起させた。

#### 精子前培養培地の組成

・ HTF Medium (Irvine)

添加：1mg/ml BSA (Sigma)

### 精子前培養培地 (400 $\mu$ l) の作成法

35mm のディッシュ (住友ベークライト) にオートピペットを用いて成熟培地 200 $\mu$ l のドロップを作製し、ミネラルオイル (ナカライテスク) で覆った。再び成熟培地のドロップに成熟培地 200 $\mu$ l を加え、400 $\mu$ l とした。続いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間以上静置し平衡化を行い、精子の前培養に用いた。

### 3. 媒精および受精率の評価

Capacitation 処理後、上澄を採取し、精子拡散の均一性、精子の運動性を観察した。さらに精子数 (濃度) を調べるため、精液懸濁液を精子数計算板 (Cell Vision) を用いて計測した。媒精に必要な精子数は以下の計算式により算出した。この場合、受精培地 200 $\mu$ l あたり  $1.0 \times 10^5$  個の精子数を最終濃度とした。

$$\text{培養液に加える精液量} = 800 / \text{実測数}$$

受精に用いる成熟卵子を 200 $\mu$ l の受精培地 (組成・作成法は後述) で 3 回洗浄した後 20 個以内で移し、精子を添加して 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 6 時間媒精を行った。

媒精終了後、100 $\mu$ l の発生培地 (組成・作製法は後述) に移し、3 回洗浄することで卵子に付着した精子を除去した。洗浄後、倒立顕微鏡下で前核形成の有無を観察し受精を判定した。その後、2 前核を形成した胚を 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で発生を継続させた。

### 受精培地 (200 $\mu$ l) の組成と作成法

・ HTF Medium (Irvine)

添加 : 4mg/ml BSA (Sigma)

35mm のディッシュ (住友ベークライト) にオートピペットを用いて受精培地



100 $\mu$ l のドロップを 3 つ作製し、ミネラルオイル（ナカライテスク）で覆った。再び成熟培地のドロップに成熟培地 100 $\mu$ l を加えることで、1 つのドロップの液量を 200 $\mu$ l とした。続いて 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間以上静置し平衡化を行い、受精に用いた。

#### 発生培地（100 $\mu$ l）の組成と作成法

・ KSOM-aa Medium (Zenith biotech)

添加：1mg/ml BSA (Sigma)

35mm のディッシュ（住友ベークライト）にオートピペットを用いて受精培地 50 $\mu$ l のドロップを 4 つ作製し、ミネラルオイル（ナカライテスク）で覆った。再び成熟培地のドロップに成熟培地 50 $\mu$ l を加えることで、1 つのドロップの液量を 100 $\mu$ l とした。続いて 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間以上静置し平衡化を行い、胚培養に用いた。

#### 4. 体外受精胚の培養と胚発生率の評価

受精後、媒精 24 時間後における 2 細胞期、媒精 120 時間後における胚盤胞期までの発生を実体顕微鏡下で観察し、2 細胞形成率および胚盤胞形成率を評価した。

#### 統計解析

受精率および胚発生率のデータは、カイ二乗検定を用いた。全てのデータは、 $P < 0.05$  のときに統計的に有意であるとした。

## 結果

卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子の体外受精・体外培養の結果は表 7 に示した。

2 前核形成率は、Grade A：87.7%、Grade B：68.4%、Grade C：48.1%であり、Grade A、Grade B、Grade C の順に有意に低下していた。

2 細胞形成率は、Grade A：96.8%、Grade B：88.9%、Grade C：76.0%であり、Grade A と比較し Grade C では有意に低下していた。

胚盤胞形成率は、Grade A：83.9%、Grade B：55.6%、Grade C：28.0%であり、Grade A、Grade B、Grade C の順に有意に低下していた。

この結果から、卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子は、体外成熟培養時の付着卵丘細胞の減少に伴い、2 前核形成率、2 細胞形成率、胚盤胞形成率が有意に低下することが明らかとなった。

### 第三節 第一分割期における染色体数の評価

得られた成熟卵子の受精後の染色体数を評価するために、体外受精後の第一分割期における胚の染色体数を調べた。

#### 材料および方法

##### 1. 体外成熟培養による成熟卵子の採取

成熟卵子の採取は第二章 第三節に準じて行った。

##### 2. 精液採取と精子の活性化

精液採取と精子の活性化は第三章 第二節に準じて行った。

##### 3. 媒精

媒精は第三章 第二節に準じて行った。

##### 4. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

媒精 6 時間後に 2 前核を形成した胚を、発生培地で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 7 時間培養を行った。その後、0.1µg/ml コルセミド (Wako) を添加した 100µl の発生培地で 3 回洗浄し、5 時間追加培養を行い、染色体標本へと供した。

固定や染色方法は、第二章 第一節の MII 期卵子と同様に行った。

染色体数が 40 本を正倍数体 (Euploid)、30-39 本を染色体不足 (Hypoploid)、41-50 本を染色体過剰 (Hyperploid)、60 本を三倍体 (Triploid) と判定した。

ギムザ染色による第一分割期胚の染色体像は図 4 に示した。

## 統計解析

染色体数正常率のデータは、カイ二乗検定を用いた。全てのデータは、 $P < 0.05$ のときに統計的に有意であるとした。

## 結果

卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた第一分割期胚の染色体数の結果は表 8 に示した。

染色体数正常の胚の割合は、Grade A : 84.2%、Grade B : 75.0%、Grade C : 53.8%であり、Grade A、Grade B、Grade C の順に低下する傾向があった。

また、染色体不足の胚の割合は、Grade A : 5.3%、Grade B : 25.0%、Grade C : 15.4%、染色体過剰の胚の割合は、Grade A : 5.3%、Grade B : 0%、Grade C : 30.8%であり、Grade C ではトリソミーが高頻度に発生していることが示された。

この結果から、本実験で設定した卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた第一分割期胚の染色体異常は、体外成熟培養時の付着卵丘細胞の減少に伴い、高い傾向にあることが明らかとなった。

#### 第四節 人為的裸化卵母細胞の成熟率と受精能、胚発生能評価および染色体数の評価

前節までに検討を行った Grade C の未成熟裸化卵母細胞は、退行過程の卵胞より回収されたために染色体異常や、受精率、胚発生率低下が見られた可能性がある。よって受精率、胚発生率が良好であった Grade A の未成熟卵母細胞をピペッティングによる人為的裸化を行うことで、Grade C の卵母細胞と成熟率、受精率、胚発生率、染色体数に違いが見られるか評価した。

#### 材料および方法

##### 1. 体外成熟培養と成熟率の評価

体外成熟培養および成熟率の評価は第二章 第三節に準じて行った。

未成熟卵母細胞回収時の卵丘細胞付着状態が Grade A (4 層以上の密な卵丘細胞が付着した COC) である未成熟卵母細胞に対して、ピペッティングにより完全に卵丘細胞を除去したものを人為的裸化卵母細胞とし、同じく回収時に卵丘細胞付着が見られない Grade C の未成熟卵母細胞を裸化卵母細胞として検討した。

##### 2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

卵子染色体標本作製と染色体数の評価は第二章 第一節に準じて行った。

##### 3. 精液採取と精子の活性化

精液採取と精子の活性化は第三章 第二節に準じて行った。

##### 4. 媒精および受精率の評価

媒精および受精率の評価は第三章 第二節に準じて行った。

## 5. 体外受精胚の培養と胚発生率の評価

体外受精胚の培養と胚発生率の評価は第三章 第二節に準じて行った。

## 結果

裸化および人為的裸化卵母細胞の成熟率、受精率、胚発生率の結果は表 9 に示した。

成熟率は、裸化卵母細胞: 51.0%、人為的裸化卵母細胞: 97.9%であり、裸化卵母細胞で有意に低下していた。

2 前核形成率は、裸化卵母細胞: 48.1%、人為的裸化卵母細胞: 60.6%であり、有意な差は見られなかった。

2 細胞形成率は、裸化卵母細胞: 76.0%、人為的裸化卵母細胞: 96.5%であり、裸化卵母細胞が有意に低下していた。

胚盤胞形成率は、裸化卵母細胞: 28.0%、人為的裸化卵母細胞: 43.9%であり、有意な差は見られないものの、裸化卵母細胞で低下する傾向が見られた。

裸化および人為的裸化卵母細胞の卵子染色体数の結果は、表 10 に示した。

染色体数正常の卵子の割合は、裸化卵母細胞: 86.8%、人為的裸化卵母細胞: 94.0%であり、有意な差は見られなかった。

PCS 発生率は、裸化卵母細胞: 47.2%、人為的裸化卵母細胞: 50.6%であり、有意な差は見られず、どちらもおよそ半数の卵子において確認された。

これらの結果から、採卵時に既に裸化状態の未成熟卵母細胞は、人為的に裸化処理を行った未成熟卵母細胞よりも核成熟能が有意に低いことから、退行過程にある卵母細胞も多く存在していたことが示唆された。一方で、受精率、胚発生率、PCS 発生率においては、人為的に裸化処理を行った卵母細胞と同様の傾向であったことから、体外成熟培養時の卵丘細胞付着が受精能、胚発生能、および PCS 発生に重要な役割を果たしていることが再確認された。

## 考察

本章では、体外成熟培養において卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子における、細胞小器官の形態的差異や、受精能、胚発生能を評価することで、成熟卵子の正常性の検証を行った。

紡錘体形態と染色体配列において、卵丘細胞付着の認められない裸化卵母細胞においては、紡錘体の過剰な伸長や染色体の散乱等の異常像が観察された。また受精能、胚発生能においては、付着卵丘細胞の減少に伴い、受精率、2細胞形成率、胚盤胞形成率の有意な低下が認められた。さらに、受精後第一分割期胚における染色体数においても、付着卵丘細胞の減少に伴い、染色体数異常率が上昇する傾向が認められた。

Shioya ら (1988) は、体外成熟培養時の付着卵丘細胞の減少に伴い、成熟率や受精率、胚発生率に差が生じると報告しており、Itagaki ら (1991) は、人為的もしくは自然に卵丘細胞が欠如した COC と、受精能の低下は関連していることと報告していることから、卵丘細胞付着と受精能、胚発生能との関連は強いことが考えられる。

染色体異常は減数分裂時の紡錘体や染色体整列の異常から起こることが知られている (Wang WH et al., 2002; Li Y et al., 2006)。紡錘体は形態的に先が鋭い形と、幅が広くタル型での差が生じ (Combelles CM et al., 2000; Sanfins A et al., 2004)、紡錘体の形態が受精能、胚発生能を評価する指標になり得る (Wang Q et al., 2007; Sakai C et al., 2011) ことが報告されている。また、体外成熟卵子は体内成熟卵子と比較し、微小管形態・構造や細胞質分布が変化する (Sanfins A et al., 2004; Moon JH et al., 2005) ことや、DNA フラグメントの割合が上昇する (Huang JY et al., 2008) ことが報告されている。これらのことから、第二減



数分裂中期における紡錘体形態の異常が、受精能、胚発生能と関連し、さらに受精後第二減数分裂時の染色体分配と関連していることが考えられる。

本章での検証の結果からも、卵丘細胞付着の認められない未成熟裸化卵母細胞より得られた成熟卵子は、紡錘体形態や染色体配列の異常、受精能、胚発生能の低下が認められ、受精後第一分割期胚における染色体数異常率の上昇が認められた。

これらのことから、卵丘細胞付着が少ない未成熟卵母細胞の体外成熟過程において紡錘体形態の異常が生じ、その異常が受精後第二減数分裂の際の染色体分配に影響を及ぼし、染色体異常へとつながった可能性が示唆された。

また、均衡型 PCS は受精後第二減数分裂後期で異数性のリスクが高くなる (Mahmood et al., 2000) ことが報告されており、第 3 章、第 4 章より、卵丘細胞付着程度の違いによって生じた PCS 発生が、受精、胚発生過程にも影響していることが明らかとなった。

卵母細胞回収時に卵丘細胞付着の認められない裸化卵母細胞は、操作の過程で卵丘細胞が脱落してしまったのか、もともと卵丘細胞が付着していないものなのかは明らかではない。卵丘細胞が付着していない卵母細胞に対する検証を行うため、十分な卵丘細胞付着が認められる未成熟卵母細胞に対して、人為的裸化处理による比較検討を行った。

卵母細胞回収時の時点で卵丘細胞付着の認められない裸化卵母細胞に比較して、人為的裸化卵母細胞は成熟率の高いものの、受精率、胚発生率、PCS 発生率においては同様の傾向が認められた。このことから、卵巣より採取された際の卵丘細胞付着の有無ではなく、体外成熟培養時の卵丘細胞の有無によって PCS 発生頻度が大きく左右されることが明らかとなった。また、回収時の裸化

卵母細胞における成熟率は低く、退行過程の卵胞由来の可能性が高いことから、成熟卵子の有用性も低いことが考えられた。

PCS 発生率が同等で、裸化卵母細胞と比較して成熟率が高い人為的裸化卵母細胞は、受精能、胚発生能、染色体数の評価を行う PCS 発生モデルとして適当であると考えられ、PCS 発生成熟卵子を作成することで、PCS を誘発する要因の探索や、改善の試みにおける検討のモデルとして用いることとした。

## 第四章

### 未成熟裸化卵母細胞の早期姉妹染色 分体分離を誘発する要因の探索

## はじめに

前章の結果、卵丘細胞付着が様々な未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子において、PCS 発生率が高かった培養条件において受精率、胚発生率が低下し、分割期における染色体数異常が上昇していたことが明らかとなった。

よって受精率、胚発生率が高く、染色体正常な卵子を得るためには、PCS 発生を低下させることが重要であると考えられるが、PCS 発生のメカニズムは明らかになっていない。そこで本章では、PCS 発生を誘発する要因を探るべく検討を行った。

## 第一節 第一減数分裂中期における紡錘体の評価

紡錘体の形態を調べるために、微小管を構成する  $\alpha$ -tubulin に対する免疫蛍光染色を行った。

まず、MII 期（第二減数分裂中期）にて既に PCS が起きていたことから、PCS 発生のタイミングを探るべく、体外成熟過程における卵子の核成熟進行を調べた。その結果、体外成熟培養 6 時間で 90%以上の卵子が卵核胞崩壊（GVBD）を起こし、8 時間では既に 70～80%の卵子が MII 期に達していた。このことから、培養 6 時間を第一減数分裂期と捉え、因子の探索を行った。

## 材料と方法

### 1. 体外成熟培養による卵子の採取と固定

体外成熟卵子の採取と固定は、第三章 第一節に準じて行った。

卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、6 時間培養を行った。

### 2. 免疫蛍光染色法による紡錘体および染色体の局在解析

免疫蛍光染色および観察は、第三章 第一節に準じて行った。

## 結果

卵丘細胞付着卵母細胞および人為的裸化卵母細胞の免疫蛍光染色の結果は図 5 に示した。

卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、紡錘体形態の違いは見られなかったが、人為的裸化卵母細胞において染色体に付着する紡錘糸が粗な様子が観察された。

## 第二節 Spindle Assembly Checkpoint (MAD2) の評価

染色体が正しく微小管に捕えられ、張力があることを確認するチェックポイントである Mad2 に対する免疫蛍光染色を行った。

### 材料と方法

#### 1. 体外成熟培養による卵子の採取と固定

体外成熟卵子の採取と固定は、第三章 第一節に準じて行った。

卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、6 時間培養を行った。

#### 2. 免疫蛍光染色法による MAD2 の局在解析

免疫蛍光染色および観察は、第三章 第一節に準じて行った。

MAD2 に対する一次抗体反応には、Polyclonal anti-MAD2 (Santa cruz biotechnology) を保存液で 200 倍希釈して用いた。抗体液 40 $\mu$ l に卵子を移し、遮光のモイストチャンバー内で 1 時間、室温で静置し一次抗体反応を行った。保存液で洗浄し、二次抗体反応液には、FITC 標識 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A-150077; Molecular probes) を保存液で 200 倍希釈して用いた。抗体液 40 $\mu$ l に卵子を移し、遮光のモイストチャンバー内で 40 分間、室温で静置し二次抗体反応を行った。保存液で洗浄し、卵子をスライドガラス上に移し、カバーガラスで覆い卵子を保定した。透過処理後に保存液で洗浄し、10 $\mu$ g/ml propidium iodide (PI, Sigma) による核染色後に保存液で洗浄した。観察には、共焦点レーザー走査顕微鏡 (MRC-1024, Bio-Rad) を使用した。

## 結果

卵丘細胞付着卵母細胞および人為的裸化卵母細胞の免疫蛍光染色の結果は図 6 に示した。

卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、**Mad2** の分布に違いは見られず、紡錘体と同様の分布が確認された。

これらの結果から、本検討での培養条件による **PCS** の発生は、第一減数分裂時の染色体への紡錘糸の付着過程にも原因がある可能性が示唆された。

## 考察

本章では、受精率、胚発生率が高く、染色体数正常な卵子を得るために、PCS 発生を低下させることが重要であると考え、PCS 発生を誘発する要因を探るべく検討を行った。

PCS は、高齢個体の卵子に生じやすいことや、その原因が主に姉妹染色体同士を結合させるコヒーシタンパクの減少による (Duncan FE et al., 2012) ことが報告されている。体細胞分裂では、分裂の際に動原体を含む姉妹染色分体同士の結合部分がすべてセパレーズによって切断され、各々が紡錘糸によって両極から捕えられて移動する。一方で減数分裂では、第一減数分裂時に組み換えが起こり、動原体部分のコヒーシサブユニットである Rec 8 のみが結合を維持された状態で、姉妹染色分体が紡錘糸によって一方のみから捕えられて移動するが、コヒーシタンパクの減少によってその結合が切断されることで PCS が生じることが報告されている。

また、PCS は姉妹染色分体同士の結合意外にも、紡錘体形態やその機能のエラーや、染色体への紡錘糸の付着エラーが原因である (Mailhes JB et al., 1997) ことが報告されている。

PCS が発生した場合、受精後の染色体整列や分配が不安定となり、染色体異常が起こる原因となる。また PCS は、染色体凝集に関わるタンパク質リン酸化が関与することが報告されているが、染色体凝集に先立って細胞質内の種々のタンパク質が集合・拡散を行っており、これに微小管が深く関わっている可能性がある。

本章では、微小管を構成する  $\alpha$ -tubulin に対する免疫蛍光染色を行い、裸化卵



母細胞において紡錘体の形態は同様であるものの、染色体に付着する紡錘糸が粗な様子が観察され、姉妹染色分体への捕捉および張力に障害がある可能性が考えられた。

また、染色体が正しく微小管に捕えられたことを確認するチェックポイントである **Mad2** に対する免疫蛍光染色を行ったが、PCS の発生率に違いが見られた卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞との **Mad2** 分布の違いは見られなかった。

本章の結果、裸化卵母細胞から得られた成熟卵子における染色体数は、ほとんどが  $n=20$  であり、量的に正常であったことから、各染色体における微小管の結合は正しく行われ、卵細胞質と第一極体に均等に分配されたことが考えられる。しかし、これまでの報告のように、姉妹染色分体同士の結合力の低下もしくは解離、または捕捉された微小管が粗であったことから、両極から付着した微小管の張力やバランスの差によって、姉妹染色分体同士の結合が剥離してしまった可能性も考えられる。

## 第五章

### 早期姉妹染色分体分離を抑制する試み

## はじめに

前章までの結果から、卵丘細胞付着程度の違いが、第一減数分裂時の紡錘体機能に影響を及ぼし、PCS 発生を引き起こしていることが示唆され、体外成熟培養技術や培養条件を改善することによって、PCS 発生を抑制する必要がある。

そこで本章では、組成の異なる培地や、裸化卵母細胞と卵丘細胞との共培養を行った場合の染色体数を評価することで、PCS 発生抑制の手掛かりにならないか検討を行った。

## 第一節 単純組成培地による PCS 発生率および受精能、胚発生能評価

これまでに体外成熟培養に用いていた培地である Waymouth's MB752/1 は、糖類や無機塩類をはじめ、ビタミン・アミノ酸が豊富な組織培地であることから、糖類や無機塩類のみの単純組成培地である HTF (human tubal fluid) 培地を用いた受精能、胚発生能および染色体数の比較を行った。

## 材料および方法

### 1. 体外成熟培養と成熟率の評価

体外成熟培養および成熟率の評価は第二章 第三節に準じて行った。

卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、培養を行った。

### 2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

卵子染色体標本作製と染色体数の評価は第二章 第一節に準じて行った。

### 3. 精液採取と精子の活性化

精液採取と精子の活性化は第三章 第二節に準じて行った。

### 4. 媒精および受精率の評価

媒精および受精率の評価は第三章 第二節に準じて行った。

### 5. 体外受精胚の培養と胚発生率の評価

体外受精胚の培養と胚発生率の評価は第三章 第二節に準じて行った。

## 結果

組成の異なる成熟培地を用いた卵丘細胞付着卵母細胞および人為的裸化卵母細胞の、卵子成熟率、受精率・胚発生率の結果は表 11 に示した。

成熟率は、Waymouth MB752/1 培地の卵丘細胞付着卵母細胞: 94.6%、人為的裸化卵母細胞: 97.9%、HTF 培地ではそれぞれ 97.2%、98.2%であり、同等の成績を示した。

2 前核形成率は、Waymouth MB752/1 培地の卵丘細胞付着卵母細胞: 87.7%、人為的裸化卵母細胞: 60.6%、HTF 培地ではそれぞれ 81.9%、89.8%であり、Waymouth MB752/1 培地において人為的裸化卵母細胞が有意に低下していたが、HTF 培地では同等の成績を示した。

胚盤胞形成率は、Waymouth MB752/1 培地の卵丘細胞付着卵母細胞: 83.9%、人為的裸化卵母細胞: 43.9%、HTF 培地ではそれぞれ 65.1%、59.8%であり、Waymouth MB752/1 培地において人為的裸化卵母細胞が有意に低下していたが、HTF 培地では同等の成績を示した。

組成の異なる成熟培地を用いた卵丘細胞付着卵母細胞および人為的裸化卵母細胞の卵子染色体数の結果は、表 12 に示した。

染色体数正常な卵子の割合は、Waymouth MB752/1 培地の卵丘細胞付着卵母細胞: 94.4%、人為的裸化卵母細胞: 94.0%、HTF 培地ではそれぞれ 92.0%、96.7%であり、両培地共に差は見られなかった。

PCS 発生率は、Waymouth MB752/1 培地の卵丘細胞付着卵母細胞: 1.1%、人為的裸化卵母細胞: 50.6%、HTF 培地ではそれぞれ 0%、3.3%であり、Waymouth MB752/1 培地において人為的裸化卵母細胞が有意に上昇していたが、HTF 培地では差は見られなかった。

この結果から、Waymouth MB752/1 培地では、これまでの結果と同様に卵丘細胞付着の有無で受精率、胚発生率、PCS 発生率に差が生じたが、単純組成培地である HTF 培地では、卵丘細胞付着の有無に関わらず、受精率、胚発生率、PCS 発生率は同等であることが明らかとなった。

## 第二節 卵丘細胞共培養による PCS 発生率評価

これまでに、体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度によって、PCS 発生率が異なり、受精能、胚発生能に影響を及ぼすことが明らかとなった。卵丘細胞が脱落した裸化卵母細胞が回収された場合、卵丘細胞の付着はなくとも、共培養を行うことで、PCS 発生を抑制する効果が得られるか、人為的裸化を行った卵丘細胞との共培養の有無で比較を行った。

### 材料および方法

#### 1. 体外成熟培養と成熟率の評価

体外成熟培養および成熟率の評価は第二章 第三節に準じて行った。

なお、人為的裸化は第三章 第四節に準じて、未成熟卵母細胞回収時の卵丘細胞付着状態が Grade A (4 層以上の密な卵丘細胞が付着した COC) である未成熟卵母細胞に対して、ピペッティングにより完全に卵丘細胞を除去したものとし、除去した卵丘細胞を卵母細胞と共に成熟培地に加えたものを共培養とした。

成熟培地は Waymouth MB752/1 のみとした。

#### 2. 卵子染色体標本作製とギムザ染色による染色体数の評価

卵子染色体標本作製と染色体数の評価は第二章 第一節に準じて行った。

### 結果

Waymouth MB752/1 培地を用い、人為的裸化卵母細胞と、人為的裸化後に卵丘細胞と共培養を行った裸化卵母細胞の体外成熟卵子の染色体数の結果は、表 13 に示した。

染色体数正常な卵子の割合は、人為的裸化卵母細胞: 94.6%、卵丘細胞共培養卵母細胞: 86.8%であり、差は見られないものの、卵丘細胞共培養において低下していた。

一方で PCS 発生率は、人為的裸化卵母細胞: 59.5%、卵丘細胞共培養卵母細胞: 34.2%であり、卵丘細胞共培養において有意に低下していた。

この結果から、卵丘細胞が付着していない裸化卵母細胞においても、卵丘細胞と共培養を行うことで、PCS 発生が軽減されることが明らかとなった。



## 考察

本章では、卵子体外成熟培養方法によって、PCS 発生リスクを軽減させることができるか、組成の異なる体外成熟培地の使用や、裸化卵母細胞と卵丘細胞との共培養を試みた。

前章までに使用した Waymouth MB752/1 培地では、同様に卵丘細胞付着の有無で受精率、胚発生率、PCS 発生率に差が生じていたが、単純組成培地である HTF 培地では、卵丘細胞付着の有無に関わらず、受精率、胚発生率、PCS 発生率は同等であった。卵丘細胞付着卵母細胞の場合、HTF 培地と比較して Waymouth MB752/1 培地の方が胚発生率が高いが、一方で人為的裸化卵母細胞では、受精率、胚発生率共に HTF 培地の方が高く、特に PCS 発生率では HTF 培地を用いることで卵丘細胞付着卵母細胞と同程度にまで抑制されていた。このことから、卵丘細胞の有無によって、成熟培地の違いで PCS 発生率が異なり、受精率および胚発生率が変化することが明らかとなった。

培地の違いと染色体異常において、A'arabi ら (1997) は組成の異なる 4 種の培地を用いて成熟率や染色体数異常率を検討しており、成熟率は培地間で差は認められないが、染色体数異常率では差が生じたことを報告している。

2 種類の成熟培地の組成の違いを図 7 に、共通する成分の含有量の違いを表 14 に示した。Waymouth MB752/1 培地は、多くのアミノ酸やビタミンが豊富に添加されている。Waymouth MB752/1 培地と HTF 培地とで共通する成分のなかでも、グルコース濃度において Waymouth MB752/1 培地が HTF 培地に比較して 10 倍程度高い濃度が含まれている。

グルコースは、卵丘細胞にて代謝され、卵母細胞へとエネルギーを供給しているが、卵丘細胞が欠如した卵母細胞単独では、グルコースを利用能が低く

(Rieger D et al., 1994、Saito et al., 1994)、卵成熟に必須ではないこと (Biggers JD et al., 1967、Cekleniak NA et al., 2001) も報告されている。さらに、Waymouth MB752/1 培地はシステインおよびシスチン濃度が高く、卵丘細胞でのグルタチオン合成に用いられて、卵母細胞と卵丘細胞の結合により卵母細胞へと取り込まれる (Funahashi et al., 1995)。グルタチオンはアミノ酸代謝や酸化ストレス緩和に関連している (Day BN et al., 1996) ことから、卵丘細胞付着がある卵母細胞の場合は、グルコース濃度の高い Waymouth MB752/1 培地の方が受精率、胚発生率が良好であると考えられる。一方で、卵丘細胞付着の認められない裸化卵母細胞にとっては、過剰なグルコースが細胞質成熟に影響を及ぼし、結果として PCS 発生が引き起こされた可能性が考えられる。

人為的裸化卵母細胞において、卵丘細胞と共培養を行うことで、PCS 発生率が抑制され、受精能および胚発生能が改善される可能性が示唆された。

卵丘細胞は、共培養により卵母細胞に付着し、卵丘細胞卵子複合体が再形成される (Diaz FJ et al., 2007) ことが報告されており、人為的裸化卵母細胞でも卵丘細胞付着卵子と同様に卵丘細胞とのコミュニケーションにより PCS 発生率の軽減に寄与した可能性が考えられる。また、卵丘細胞付着がなくとも、卵丘細胞によるグルコース代謝により、卵母細胞単独において過剰なグルコースが消費されることも考えられる。

本章の結果、卵丘細胞付着が認められない卵母細胞は、単純組成培地で培養を行うこと、卵丘細胞と共培養を行うことで PCS 発生が抑制されることが明らかとなった。

## 第六章

### 総括

未成熟卵母細胞の体外成熟培養 (IVM) は、卵巣に数多く存在する未成熟卵母細胞を有効活用できる技術として、ウシやブタなどの家畜で開発され、現在ではヒト生殖補助医療において、身体的負担の少ない治療法として応用されている。しかし、体外成熟卵子は体内成熟卵子と比較し、胚発生率や着床率が未だ低いのが現状である (Cha KY et al., 2000; Child TJ et al., 2001; Piquette GN, 2006; Lanzendorf SE, 2006)。これまでに、着床率の低さは染色体異常が関連していること (Requena A et al., 2009)、染色体異常は主に卵子の第一減数分裂時に生じること (Hassold T et al., 1980; Angell RR et al., 1994; Hunt PA et al., 1998) が報告されている。ヒト卵子は染色体異常発生頻度が高く、次世代以降にも遺伝的疾患として影響する可能性があるため、染色体異常は重要な問題である。

本研究では、染色体異常のリスクが低い体外成熟培養系を確立することを目的として、マウス卵子をモデルとして体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における卵子染色体異常を誘発する要因の究明と、体外成熟培養条件の改善を試みた。

第二章では、未成熟卵母細胞の体外成熟培養過程において、温度、気層条件、培地の組成など様々な培養条件があるが、卵子成熟および染色体数に影響を及ぼす培養条件を探索すべく、培養時間を 4 区、卵丘細胞の付着程度を 3 区に分類し、卵子成熟率および染色体数を評価した。

はじめに体内成熟卵子と体外成熟卵子の染色体数を調べたところ、染色体数正常率に差は見られなかった。次に培養時間を 10、12、16、20 時間に設定し、成熟率および染色体数を調べたところ、培養 10 時間で既にほとんどの卵子が MII 期に達しており、成熟率は 10 時間以降プラトーに達していた。染色体数正

常率は培養時間によって差は見られず、成熟後のエイジングによる影響も見られなかった。

体外成熟培養時の卵丘細胞付着は、成熟率や受精率、胚発生率と関連すると報告があることから、体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度と成熟率および染色体数を調べたところ、付着卵丘細胞の減少に伴い、成熟率の有意な低下が認められた。染色体数正常率は、卵丘細胞付着程度の違いによって差は見られなかったが、付着卵丘細胞の減少に伴い、PCS 発生率の有意な上昇が認められた。

よって、卵丘細胞付着程度の違いが、未成熟卵母細胞の核成熟および PCS 発生に影響を与えること因子であることが明らかとなった。

第三章では、卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子の正常性を調べるべく、卵子の細胞小器官や受精能、胚発生能、染色体数を評価した。

はじめに紡錘体および染色体の形態を調べるために、微小管を構成する  $\alpha$ -tubulin に対する免疫蛍光染色を行ったところ、十分な卵丘細胞付着が認められる卵母細胞の場合、コンパクトな樽型の形態を示し、染色体は紡錘体内に一列に整列していたが、卵丘細胞付着が認められない卵母細胞の場合、紡錘体が伸長し、長方形様の形態を示し、染色体は紡錘体範囲外にも散在している様子が観察された。

次に、体外受精を行ったところ、受精率は付着卵丘細胞の減少に伴い、有意な低下が認められ、2 細胞形成率、胚盤胞形成率においても同様に有意な低下が認められた。

受精後の染色体分配が正しく行われたかを評価するため、前核確認 7 時間後にコルセミド処理を 5 時間行い、第一分割期胚の染色体数を調べた。染色体数

正常率は付着卵丘細胞の減少に伴い低下しており、裸化卵母細胞においてはトリソミーが高頻度に発生していることが示唆された。

未成熟卵母細胞回収時の裸化卵母細胞は、退行過程の卵胞より回収されたために染色体異常の上昇や、受精率、胚発生率の低下が見られた可能性があることから、十分な卵丘細胞付着が認められる卵母細胞の卵丘細胞を人為的に裸化し、卵丘細胞付着が認められない裸化卵母細胞と成熟率、受精率、胚発生率、染色体数に違いが見られるか調べた。

人為的裸化卵母細胞において、成熟率、2細胞形成率が有意に上昇していたが、受精率、胚盤胞形成率は裸化卵母細胞と差は見られなかった。染色体数正常率に差は見られず、PCS発生率においても差は見られず、どちらも高頻度であった。

よって卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子は、卵丘細胞付着の減少に伴い紡錘体形態や染色体配列が異なることが明らかとなった。また受精率、胚発生率においては、卵丘細胞付着の減少に伴い、有意な低下が認められ、第一分割期における染色体数においても染色体数正常率の低下が認められた。

また、採卵時に既に裸化状態の未成熟卵母細胞は、人為的に裸化处理を行った未成熟卵母細胞よりも核成熟能が有意に低いことから、退行過程にある卵子も多く存在していたことが示唆された。一方で、受精率、胚発生率、PCS発生率においては、体外成熟培養時に裸化状態の卵母細胞と同様の傾向であったことから、体外成熟培養時の卵丘細胞付着が、PCS発生および受精能、発生能に重要な役割を果たしていることが再確認された。

第四章では、受精率、胚発生率が高く、染色体正常な卵子を得るためには、

PCS 発生を低下させることが重要であると考えられたことから、PCS 発生を誘発する要因を探るべく検討を行った。

はじめに、紡錘体の形態を調べるために、微小管を構成する  $\alpha$ -tubulin に対する免疫蛍光染色を行った。その結果、卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、紡錘体形態の違いは見られなかったが、人為的裸化卵母細胞において染色体に付着する紡錘糸が粗な様子が観察された。

次に、染色体が正しく微小管に捕えられ、張力があることを確認するチェックポイントである Mad2 に対する免疫蛍光染色を行った。その結果、卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、Mad2 の分布の違いは見られず、紡錘体と同様の分布が確認された。

よって、本検討での培養条件による PCS の発生は、第一減数分裂時の染色体への紡錘糸の付着過程にも原因がある可能性が示唆された。

第五章では、体外成熟培養技術や培養条件を改善することによって、PCS 発生を抑制する必要があると考え、組成の異なる培地や、裸化卵母細胞と卵丘細胞との共培養を行った場合の染色体数を評価することで、PCS 発生抑制の手掛かりにならないか検討を行った。

はじめに、裸化卵母細胞において PCS 発生が高頻度で起きていた際に使用した培地である Waymouth's MB752/1 は、糖類や無機塩類をはじめ、ビタミン・アミノ酸が豊富な組織培地であることから、糖類や無機塩類のみの単純組成培地である HTF 培地と受精能、胚発生能および染色体数の比較を行った。その結果、成熟率に差は見られず、Waymouth MB752/1 培地では、卵丘細胞付着の有無で受精率、胚発生率に差が生じたが、HTF 培地では、卵丘細胞付着の有無に関わらず、受精率、胚発生率は同等であった。染色体数正常率に差は見られな

かったものの、HTF 培地の卵丘細胞付着卵母細胞、人為的裸化卵母細胞は、Waymouth MB752/1 培地の人為的裸化卵母細胞よりも有意に PCS 発生率が低くなった。

次に、人為的裸化处理を行った卵母細胞において、単独で培養を行った場合と、除去した卵丘細胞と再び共培養を行った場合の染色体数の比較を行った。その結果、染色体数正常率に差は見られないものの、卵丘細胞と共培養を行った人為的裸化卵母細胞において有意に PCS 発生率が低くなった。

よって、卵丘細胞付着が認められない卵母細胞は、単純組成培地で培養を行うこと、卵丘細胞と共培養を行うことで PCS 発生が抑制され、その結果受精能、発生能も改善する可能性があることが明らかとなった。

本研究より得られた主な結果は以下の通りである。

1. マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養において、卵丘細胞付着が成熟率および早期姉妹染色分体分離の発生率に影響を与え、受精率、胚発生率および受精後の染色体数正常率にも影響を及ぼすことが明らかとなった。
2. マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養において、卵丘細胞付着の認められない卵母細胞は、単純組成培地の選択や卵丘細胞との共培養を行うことによって、早期姉妹染色分体分離の発生を抑制できることが明らかとなった。

本研究で明らかとなった、体外成熟過程における早期姉妹染色分体分離の発生とその抑制法は、体外成熟卵子の受精率、胚発生率、着床率の改善へと役立つものと思われる。また、ヒト生殖補助医療分野における難治症例における救



済策となり、畜産分野においても、希少動物における卵母細胞の体外成熟培養において有効な技術となる可能性がある。また、PCS 発生がもたらす次世代への影響への手掛かりとなり、最終的には健児の獲得へとつながる、さらに染色体異常発生リスクの低い体外成熟培技術の開発へ繋がるものと期待される。

## 図表

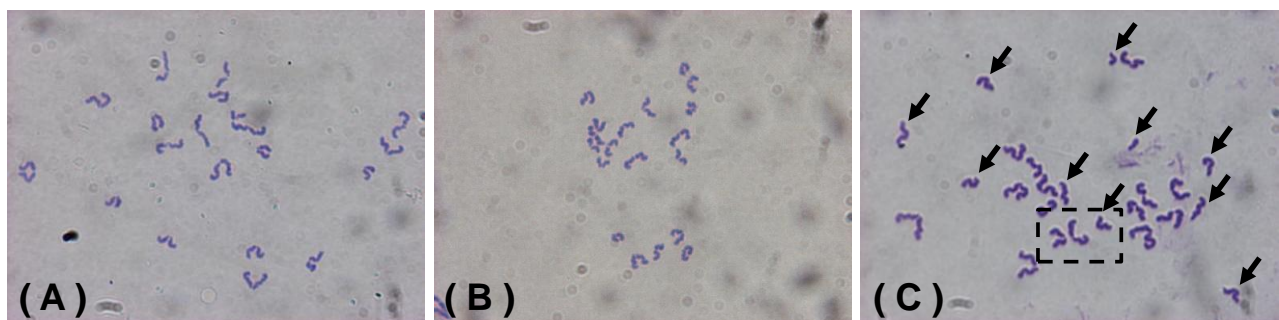


図1. ギムザ染色による第二減数分裂中 (Metaphase II) 期卵子の染色体像

(A) 正倍数体 (Euploidy)  $n=20$

(B) 染色体不足 (Hypoploidy)  $n=19$

(C) 早期姉妹染色分体分離 (Premature chromatid separation; PCS)  $n=20$

(C') 染色体拡大図

矢印は染色分体、矢頭は動原体部分を示す

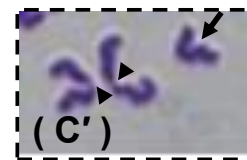


表1. 未成熟卵母細胞の体外成熟培養による成熟率

培地	供試卵子数	GV ( % )	GVBD ( % )	MII ( % )
Waymouth	157	5 ( 3.2)	9 ( 5.7)	143 (91.1)

表2. 体内成熟卵子と体外成熟卵子の卵子染色体数

供試卵子	分析 卵子数	Ploidy ( % )				PCS ( % )
		Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
体内成熟卵子	110	103 (93.6)	7 ( 6.4)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.9)
体外成熟卵子	109	102 (93.6)	7 ( 6.4)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.9)

有意差なし (P>0.05)

表3. 体外成熟培養時間の違いによる成熟率

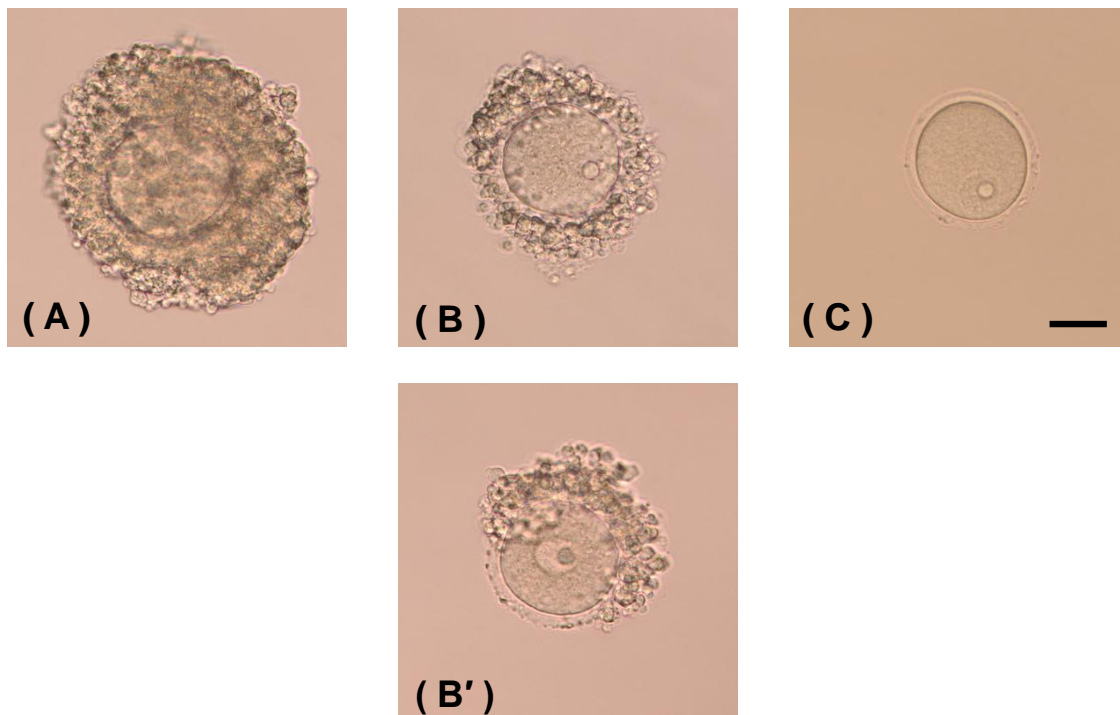
培地	培養 時間	供試卵子数	GV ( % )	GVBD ( % )	MII ( % )
Waymouth	10h	123	2 ( 1.6)	4 ( 3.3)	117 (95.1)
	12h	122	1 ( 0.8)	5 ( 4.1)	116 (95.1)
	16h	145	1 ( 0.7)	4 ( 2.8)	140 (96.6)
	20h	135	0 ( 0.0)	3 ( 2.2)	132 (97.8)

有意差なし (P>0.05)

表4. 体外成熟培養時間の違いにより得られた成熟卵子の染色体数

培地	培養時間	分析 卵子数	Ploidy ( % )				PCS ( % )
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	10h	93	87 (93.5)	6 ( 6.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 3.2)
	12h	90	84 (93.3)	6 ( 6.7)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 1.1)
	16h	104	93 (89.4)	10 ( 9.6)	0 ( 0.0)	1 ( 1.0)	2 ( 1.9)
	20h	94	85 (90.4)	8 ( 8.5)	1 ( 1.1)	0 ( 0.0)	1 ( 1.1)

有意差なし (P>0.05)



**図2. 採卵時における卵丘細胞付着程度による未成熟卵母細胞の分類**

(A) Grade A: 4層以上の密な卵丘細胞が付着

(B) Grade B: 3層以下の卵丘細胞が付着、(B') Grade B: 部分的に卵丘細胞が付着

(C) Grade C: 卵丘細胞の付着がなく、裸化状態

Bar=50μm

表5. 体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度の違いによる成熟率

培地	卵丘細胞 付着程度	供試卵子数	GV ( % )	GVBD ( % )	MII ( % )
Waymouth	Grade A	114	0 ( 0.0) <sup>a</sup>	2 ( 1.8) <sup>a</sup>	112 (98.2) <sup>a</sup>
	Grade B	95	9 ( 9.5) <sup>b</sup>	5 ( 5.3) <sup>a</sup>	81 (85.3) <sup>b</sup>
	Grade C	92	18 (19.6) <sup>c</sup>	24 (26.1) <sup>b</sup>	50 (54.3) <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05)



表6. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵丘細胞 付着程度	分析 卵子数	Ploidy ( % )				PCS ( % )
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	Grade A	89	84 (94.4)	5 (5.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 ( 1.1) <sup>a</sup>
	Grade B	66	63 (95.5)	3 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (10.6) <sup>b</sup>
	Grade C	53	46 (86.8)	1 (1.9)	3 (5.7)	3 (5.7)	25 (47.2) <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05)

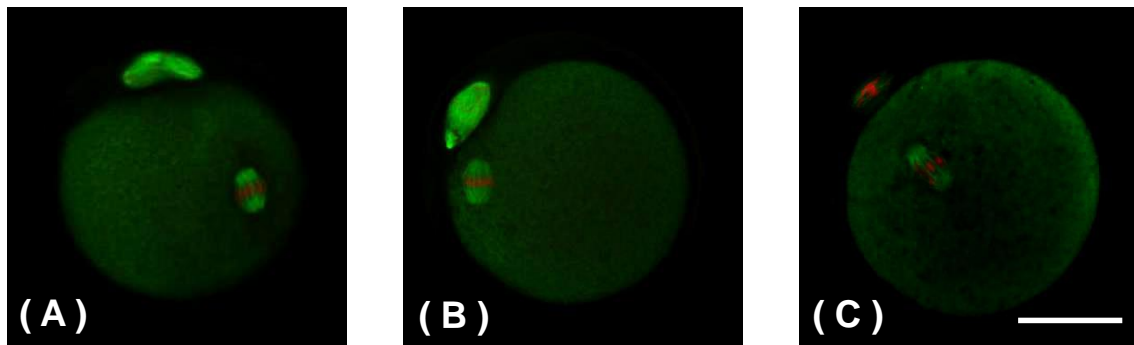


図3. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第二減数分裂中 (Metaphase II) 期卵子の微小管および染色体の局在

(A) Grade A: 4層以上の密な卵丘細胞が付着

(B) Grade B: 3層以下の卵丘細胞が付着もしくは部分的に卵丘細胞が付着

(C) Grade C: 卵丘細胞の付着がなく、裸化状態

緑: 微小管 ( $\alpha$ -tubulin)、赤: 染色体、Bar=50 $\mu$ m

表7. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子の受精・発生率

培地	卵丘細胞 付着程度	供試卵子数	2前核形成数 ( % )	2細胞形成数 ( % )	胚盤胞形成数 ( % )
Waymouth	Grade A	106	93 (87.7) <sup>a</sup>	90 (96.8) <sup>a</sup>	78 (83.9) <sup>a</sup>
	Grade B	79	54 (68.4) <sup>b</sup>	48 (88.9) <sup>a,b</sup>	30 (55.6) <sup>b</sup>
	Grade C	52	25 (48.1) <sup>c</sup>	19 (76.0) <sup>b</sup>	7 (28.0) <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05)

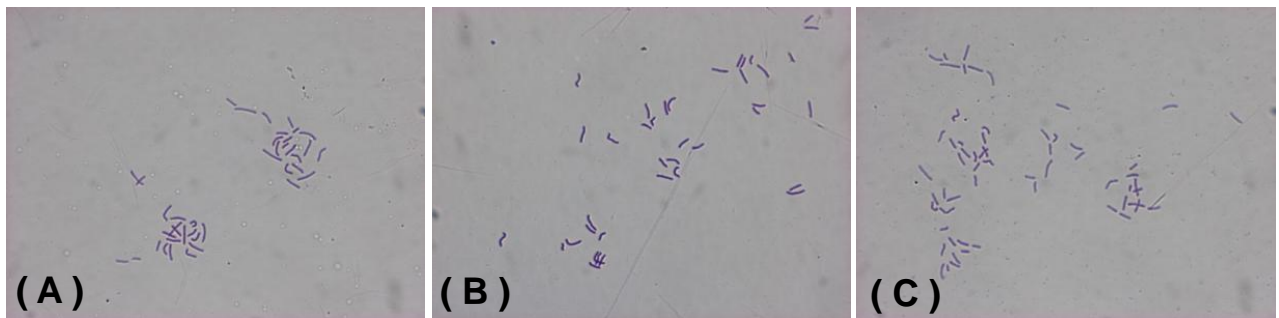


図4. ギムザ染色による第一分割期胚の染色体像

(A) 正倍数体 (Euploidy)  $2n=40$

(B) 染色体不足 (Hypoploidy)  $2n=38$

(C) 三倍体 (Triploidy)  $3n=60$

表8. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第一分割期胚の染色体数

培地	卵丘細胞 付着程度	分析 卵子数	Ploidy ( % )			
			Euploid 2n=40	Hypoploid 2n=30 - 39	Hyperploid 2n=41 - 50	Triploid 3n=60
Waymouth	Grade A	38	32 (84.2)	2 ( 5.3)	2 ( 5.3)	2 ( 5.3)
	Grade B	20	15 (75.0)	5 (25.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)
	Grade C	13	7 (53.8)	2 (15.4)	4 (30.8)	0 ( 0.0)

有意差なし (P>0.05)

表9. 裸化および人為的裸化卵母細胞より得られた成熟卵子の受精・発生率

培地	卵子の 状態	供試 卵子数	成熟卵子数 ( % )	2前核形成数 ( % )	2細胞形成数 ( % )	胚盤胞形成数 ( % )
Waymouth	裸化	102	52 (51.0) <sup>b</sup>	25 (48.1)	19 (76.0) <sup>b</sup>	7 (28.0)
	人為的 裸化	96	94 (97.9) <sup>a</sup>	57 (60.6)	55 (96.5) <sup>a</sup>	25 (43.9)

<sup>a-b</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.025)

表10. 裸化および人為的裸化卵母細胞より得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵子の 状態	分析 卵子数	Ploidy ( % )				PCS ( % )
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	裸化	53	46 (86.8)	1 (1.9)	3 (5.7)	3 (5.7)	25 (47.2)
	人為的 裸化	83	78 (94.0)	4 (4.8)	0 (0.0)	1 (1.2)	42 (50.6)

有意差なし (P>0.05)

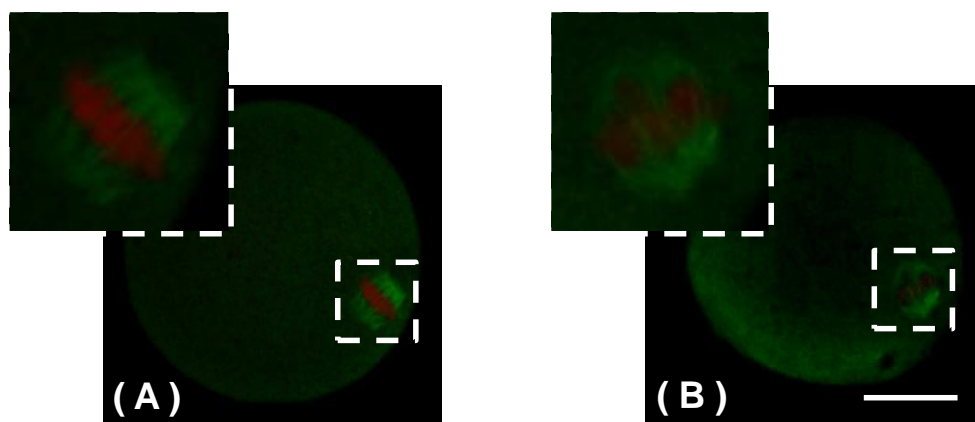


図5. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第一減数分裂中 (Metaphase I) 期

卵子の微小管および染色体の局在

(A) 卵丘細胞付着卵母細胞

(B) 人為的裸化卵母細胞

緑: 微小管 ( $\alpha$ -tubulin)、赤: 染色体、Bar=50 $\mu$ m



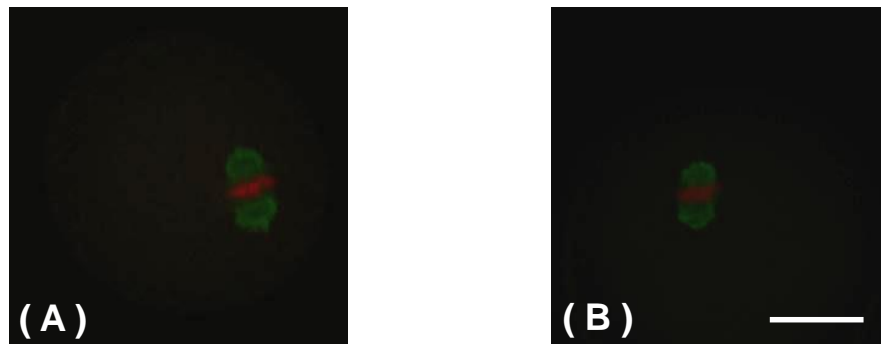


図6. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第一減数分裂中 (Metaphase I) 期  
卵子のMad2の局在

(A) 卵丘細胞付着卵母細胞

(B) 人為的裸化卵母細胞

緑: Mad2、赤: 染色体、Bar=50 $\mu$ m

表11. 組成の異なる成熟培地から得られた成熟卵子の受精・発生率

培地	卵丘細胞 付着状態	供試 卵子数	成熟卵子数 (%)	2前核形成数 (%)	2細胞形成数 (%)	胚盤胞形成数 (%)
Waymouth	卵丘細胞 付着	112	106 (94.6)	93 (87.7) <sup>a</sup>	90 (96.8)	78 (83.9) <sup>a</sup>
	人為的 裸化	102	94 (97.9)	57 (60.6) <sup>b</sup>	55 (96.5)	25 (43.9) <sup>b</sup>
HTF	卵丘細胞 付着	108	105 (97.2)	86 (81.9)	84 (97.7)	56 (65.1)
	人為的 裸化	110	108 (98.2)	97 (89.8)	93 (95.9)	58 (59.8)

<sup>a-b</sup> 同培地の異符号間に有意差あり (P<0.025)

表12. 組成の異なる成熟培地から得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵丘細胞 付着状態	分析 卵子数	Ploidy ( % )				PCS ( % )
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	卵丘細胞 付着	89	84 (94.4)	5 (5.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 ( 1.1) <sup>a</sup>
	人為的 裸化	83	78 (94.0)	4 (4.8)	0 (0.0)	1 (1.2)	42 (50.6) <sup>b</sup>
HTF	卵丘細胞 付着	87	80 (92.0)	6 (6.9)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 ( 0.0)
	人為的 裸化	90	87 (96.7)	2 (2.2)	0 (0.0)	1 (1.1)	3 ( 3.3)

<sup>a-b</sup> 同培地の異符号間に有意差あり (P<0.005)

表13. 卵丘細胞共培養の有無により得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵丘細胞 の状態	分析 卵子数	Ploidy ( % )				PCS ( % )
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	人為的裸化	37	35 (94.6)	2 ( 5.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (59.5) <sup>b</sup>
	卵丘細胞 共培養	38	33 (86.8)	4 (10.5)	1 (2.6)	0 (0.0)	13 (34.2) <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05)

### Waymouth's MB 752/1 Medium

#### <無機塩類>

NaCl  
KCl  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
MgSO<sub>4</sub>  
CaCl<sub>2</sub>  
NaHCO<sub>3</sub>  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
MgCl<sub>2</sub>

#### <Others>

Glucose  
Hypoxanthine  
Glutathione  
(+Sodiumu pyruvate)

#### <アミノ酸>

L-Arginine  
L-Cysteine  
L-Glutamic Acid  
Glycine  
L-Isoleucine  
L-Lysine  
L-Phenylalanine  
L-Threonine  
L-Tyrosine  
L-Aspartic Acid  
L-Cystine  
L-Glutamine  
L-Histidine  
L-Leucine  
L-Methionine  
L-Proline  
L-Tryptophan  
L-Valine

#### <ビタミン>

Ascorbic Acid  
D-Ca Pantothenate  
Folic Acid  
Niacinamide  
Riboflavin  
Vitamin B12  
Biotin  
Choline Chloride  
I-Inositol  
Choline Chloride  
Thamine

### HTF (human tubal fluid) Medium

#### <無機塩類>

NaCl  
KCl  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
MgSO<sub>4</sub>  
CaCl<sub>2</sub>  
NaHCO<sub>3</sub>

#### <Others>

Glucose  
Sodiumu lactate  
Sodiumu pyruvate  
Sodiumu citrate

図7. 2種類の卵子体外成熟培地 組成の違い

表14. 2種類の卵子体外成熟培地 共通成分の含有量の違い

	Waymouth's MB 752/1 ( mM )	HTF ( mM )
Calcium Chloride( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.816	2.04
Magnesium Sulfate( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.813	0.20
Potassium Chloride(KCl)	2	4.69
Potassium Phosphate monobasic( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.588	0.37
Sodium Bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ )	26.67	25.00
Sodium Chloride(NaCl)	103.45	97.80
Glucose	27.78	2.7
Sodium Pyruvate	0.23	0.33

## 引用文献

- A'arabi SY, Roussel JD, Chandler JE. Chromosomal analysis of mammalian oocytes matured in vitro with various culture systems. *Theriogenology* 1997;48:1173-83.
- Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT. First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* 1994;65:194-202.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:560-7.
- Brower PT, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol* 1982;90:144-53.
- Cekleniak NA, Combelles CM, Ganz DA, Fung J, Albertini DF, Racowsky C. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:1185-93.
- Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000;73:978-83.
- Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001;76:936-42.
- Chin AH, Chye NS. Investigations of oocyte in vitro maturation within a



- mouse model. *Zygote* 2004;12:1-18.
- Combelles CM, Carabatsos MJ, London SN, Mailhes JB, Albertini DF. Centrosome-specific perturbations during in vitro maturation of mouse oocytes exposed to cocaine. *Exp Cell Res* 2000;260:116-26.
- Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* 2007;120:1330-40.
- Duncan FE, Homick JE, Lampson MA, Schultz RM, Shea LD, Woodruff TK. Chromosome cohesion decreases in human eggs with advanced maternal age. *Aging Cell* 2012;11(6):1121-4.
- Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM, Carrell DT. In vitro oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy. *Fertil Steril* 2005;84:1027-29.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 1998;49:415-22.
- Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004;70:535-47.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1994;51(4):633-9.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J. et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*

1980;44:151-78.

Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280-91.

Huang JY, Chen HY, Park JY, Tan SL, Chian RC. Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro- and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. *Fertil Steril* 2008;90:1424-32.

Hunt PA, LeMaire-Adkins R. Genetic control of mammalian female meiosis. *Curr Top Dev Biol* 1998;37:359-81.

Itagaki Y, Toyoda Y. Factors affecting fertilization in vitro of mouse eggs after removal of cumulus oophorus. *J Mamm Ova Res* 1991;8:126-34.

Lanzendorf SE. Developmental potential of in vitro- and in vivo-matured human oocytes collected from stimulated and unstimulated ovaries. *Fertil Steril* 2006;85:836-7.

Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S, et al. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertil Steril* 2006;85:827-32.

Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007;21:2037-55.

Mahmood R, Brierley CH, Faed MJ, Mills JA, Delhanty JD. Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet* 2000;106(6):620-6.

Mailhes JB, Young D, London SN. 1,2-propanediol-induced premature centromere separation in mouse oocytes and aneuploidy in one-cell zygotes.

- Biol Reprod 1997;57(1):92-8.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. J Reprod Fertil Suppl 1999;54:449-60.
- Moon JH, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, et al. Spindle positions and their distributions in in vivo and in vitro matured mouse oocytes. Hum Reprod 2005;20:2207-10.
- Moor R, Dai Y. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. Reprod Suppl 2001;58:91-104.
- Murakawa H, Aono N, Tanaka T, Kikuchi H, Yoshida H, Yoshida H, et al. Morphological Evaluation and Measurement of the Respiration Activity of Cumulus-oocyte Complexes to Assess Oocyte Quality. J Mamm Ova Res 2009;26:32-41.
- Ocaña-Quero JM, Pinedo-Merlín M, Moreno-Millán M. Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. Theriogenology 1999;51:667-72.
- Piquette GN. The in vitro maturation (IVM) of human oocytes for in vitro fertilization (IVF): is it time yet to switch to IVF-IVF?. Fertil Steril 2006;85:833-5.
- Requena A, Bronet F, Guillén A, Aquado D, Bou C, García-Velasco JA. The impact of in-vitro maturation of oocytes on aneuploidy rate. Reprod Biomed Online 2009;18:777-83.
- Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. J

- Reprod Fertil 1994;100:257-62.
- Roberts R, Iatropoulou A, Ciantar D, Stark J, Becker DL, Franks S, et al. Follicle-stimulating hormone affects metaphase 1 chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. Biol Reprod 2005;72:107-18.
- Sakai C, Hoshino Y, Sato Y, Sato E. Evaluation of maturation competence of metaphase II oocytes in mice based on the distance between pericentriolar materials of meiotic spindle: distance of PCM during oocyte maturation. J Assist Reprod Genet 2011;28:157-66.
- Saito T, Hiroi M, Kato T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. Biol Reprod 1994;50:266-70.
- Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF. Meiotic spindle morphogenesis in in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. Hum Reprod 2004;19:2889-99.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology 1988;30:489-96.
- Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski M. Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. Theriogenology 2003;60:571-81.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. Hum Reprod Update

2003;9:35-48.

Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001;121:51-75.

Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2007;87:1053-8.

Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:1-12.

Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril* 2002;78:1077-81.

Xu YW, Peng YT, Wang B, Zeng YH, Zhuang GL, Zhou CQ. High follicle-stimulating hormone increases aneuploidy in human oocytes matured in vitro. *Fertil Steril* 2011;95:99-104.

Yamanaka M, Setoyama T, Igarashi Y, Kurosawa K, Itani Y, Hashimoto S, Saitoh K, Takei M, Hirabuki T. Pregnancy outcome of fetuses with trisomy 18 identified by prenatal sonography and chromosomal analysis in a perinatal center. *Am J Med Genet A* 2006;140(11):1177-82.

Zenzes MT, Casper RF. Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet* 1992;88:367-75.

## 謝辭

本稿を終えるにあたり、本研究を通じて終始懇切な御指導を頂いた東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻動物生殖科学分野教授 種村健太郎博士、前教授 佐藤英明博士、准教授 原健士朗博士、助教 星野由美博士に心より御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、丁寧なご指導を頂いた吉田レディースクリニック院長 吉田仁秋博士、京野アートクリニック培養部門長 青野展也博士、宇都宮大学農学部生物生産科学科動物生産学講座動物育種繁殖学研究室教授 吉澤緑博士に深く感謝申し上げます。

社会人でありながら、本分野研究生を経て、無事に博士課程を修了することができたのは、公私にわたって支えてくださった私の勤務先である吉田レディースクリニック培養室スタッフと、動物生殖科学分野の先輩ならびに後輩および諸氏の御指導と御助力の賜物であり心より感謝し御礼申し上げます。

最後に、いつも温かく見守り支えてくれた父と母に、心より感謝し御礼申し上げます。